

【総説】

病的組織の微小環境下における血管壁脆弱性

Fragility of vascular wall in pathological microenvironment

金沢大学大学院医学系研究科
法・社会環境医学
(法医学)

塚 正 彦

1. はじめに

心血管系疾患の外科手術及び冠動脈インターベンションでは、大血管及び中小の動静脈レベルが治療対象となる。その一方で、薬物治療における標的を考える際、毛細血管レベルに至る小さな径を有する血管を、微視的観点から検討することが必要となる。血管病変の自然経過による破綻と修復・再生機転、さらに一般的治療がもたらす治癒機転及び薬物療法の作用点等、実際に微小環境で起こっている事象を微視的に観察・評価して得られるものは決して少なくない。

今回、動脈粥状硬化性病変の研究で得られた血管壁組織脆弱性の知見が、悪性腫瘍進展や動脈瘤発生機序の解析に有用である点を強調し、さらにプロテアーゼ活性解析の方法が、病理診断学的領域から心血管系疾患の治療戦略及び法医学実務に広く応用可能である点を含めて論じる。

2. 動脈粥状硬化性病変脆弱化の機序と新規方法論の開発

筆者は大学院博士課程で、勝田省吾先生（現金沢医科大学教授）の直接指導で大動脈粥状硬化進展に関わるプロテアーゼ活性の研究を始め、岡田保典先生（現慶応大学教授）から生体内において数々の重要な現象に関わる matrix metalloproteinase (以下MMP) を解析する基礎的方法を学んだ。

MMPは生体内において中性域で活性を示すカルシウム依存性プロテアーゼのジーンファミリーの一つである（表1）。ゼラチナーゼは表の上2段に示すように、ゼラチンを基質とするもののうち、一部ドメインの長さの違いから区別されたMMP-2（別名ゼラチナーゼA）とMMP-9（別名ゼラチナーゼB）よりなる。MMP-2とMMP-9はゼラチナーゼを基質にするので、0.1%ゼラチンを基質に用いたSDSサイズグラフィーにおいて分子量72kD、92kDの位置でゼラチン分解活性を示す明るく抜けたバ

MMP	DOMAIN STRUCTURE	MAJOR SUBSTRATES
Gelatinase A (MMP-2, 72kDa gelatinase, IV collagenase, EC 3.4.24.24)	PRE PRO CAT FN CAT H	Gelatins, collagen IV, collagen I
Gelatinase B (MMP-9, 92kDa gelatinase, IV collagenase, EC 3.4.24.35)	PRE PRO CAT FN CAT C H	Gelatins, collagen IV, collagen V
Matrilysin (MMP-7, pump-1) (EC 3.4.24.23)	PRE PRO CAT	Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins, elastin
Interstitial Collagenase (MMP-1, EC 3.4.24.7)		Fibrillar Collagens
Neutrophil Collagenase (MMP-8, EC 3.4.24.34)	PRE PRO CAT H	Fibrillar Collagens
Collagenase-3 (MMP-13)		Fibrillar Collagens
Stromelysin-1 (MMP-3, transin, EC 3.4.24.17)		Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins
Stromelysin-2 (MMP-10, transin-2, EC 3.4.24.22)		Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins
Metalloelastase (MMP-12, EC 3.4.24.65)		Elastin
MMP-18		N.D.
MMP-19		N.D.
Stromelysin-3 (MMP-11)	PRE PRO F CAT H	Laminin and fibronectin (weakly)
MT1-MMP (MMP-14)		Gelatinase A, fibrillar collagens, proteoglycans, ECM glycoproteins
MT2-MMP (MMP-15)	PRE PRO F CAT H	N.D.
MT3-MMP (MMP-16)		N.D.
MT4-MMP (MMP-17)		Gelatinase A
		N.D.

表1. MMPs ジーンファミリー

ンドで検出可能である。さらに試料の分解がMMPによる分解である事の証明はEDTA (エチレンジアミン四酢酸), セリンプロテアーゼインヒビター及びアスパラギン酸プロテアーゼインヒビターを用いる阻害実験とウェスタンブロットで確認した。

最初は大動脈と冠動脈を材料に、動脈硬化の初期病変とされるびまん性内膜肥厚と進行性病変である粥腫を対象とした。びまん性内膜肥厚は中膜由来の血管平滑筋細胞とそれが産生する細胞外マトリックスが主体であり、試料としてはほぼ均一であるが、粥腫は脂質コアを中心とした立体的構造を有するため実体顕微鏡下で試料を細切した上での検討を要した。新鮮組織材料を立方体に細切した後RPMI中で組織培養し、培養上清を生化学的解析に用いた。隣接する組織と培養後の組織材料を用いてヘマトキシリン・エオジン染色による形態観察と免疫組織化学的検討を行った。

実体顕微鏡下で区別された新鮮粥腫材料の培養上清を用いて、放射性同位元素で標識されたゼラチン、I型コラーゲンおよびエラスチンを基質とする消化試験及び免疫組織化学的手法で、部位によって異なる基質が各種プロテアーゼにより分解されている様子が明らかにされた(図1)。

細胞外マトリックスの分解を調べる一方で、病変内のコラーゲン産生とのバランス面を考慮した。特に薬剤やサイトカイン添加時の培養平滑筋細胞のコラーゲン産生実験から、冠動脈作動薬の1種である抗血小板薬trapidilがコラーゲンの型別産生比率を変動させることがわかった。In situ hybridizationの手法を用い、プラーク表面部分の弾性線維を構成するエラスチンにも注目した。その結果MMP-12を含めたエラスチンを基質とするMMPとその阻害物質のバランスの乱れが、エラスチン分解による組織の弾性減少をもたらし、最終的に破綻を引き起こしていることが示された⁹⁾。MMPは主に細胞外にlatent formとして一旦細胞外に分泌された後、限定分解を受けactive formとしてプロテアーゼ活性を示す。従って、実際のMMPsの組織内活性は、細胞外に分泌後の分布と阻害剤であるtissue inhibitors of metalloproteinases (以下TIMPs) とのバランスの乱れを以て評価される。

組織学的に比較的均一な動脈硬化早期病変と、実体顕微鏡下で5分割の切離を必要とした進行性病変いわゆる粥腫材料の解析後、病変内における1)細胞間のクロストーク、2)血流と血管壁の相互作用、3)細胞外マトリックスと遊走細胞の相対的位置関係を明らかにするために、新しい方法論が必要となった。1994年Galis⁹⁾は、血管組織内のゼラチン分解活性を知る方法としてin situ zymographyを用いたが、①ガラススライド上で不安定であることや②放射性同位元素を用いるため簡便でない、さらに③上記1~3)の要求に充分応じていないとの理由で普及には至らなかった。

我々は基質とMMP産生細胞の分布及び局所でのプロテアーゼ活性化機序を同時に把握するために、富士フィルム株式会社と共同開発したポリエステルフィルムの支持体に7 μ mの厚さのゼラチンを塗布して、その上に新鮮材料の凍結切片を乗せ37℃でインキュベーションして基質分解の程度を測る一方、同一切片上で免疫組織化学を行い、産生細胞と活性化に関与する細胞を同定可能とした(film in situ zymography: 以下FIZ「プロテアーゼ活性の測定法」特願平11-174826; 特許公開2001-197 図2)。組織に作用する試薬の薬理作用は組織培養液に濃度を変えて添加することで評価可能であった。

FIZとヒト新鮮血管組織材料から得られた事実イ〜ハ)を以下にまとめる。

イ) 動脈硬化初期病変の検討

びまん性内膜肥厚は新生児から10代にかけての血管径の成長に必要なリモデリングにも関与しており、内腔の狭窄率は年齢と正の相関を示すが、筆者らの消化試験とSDSゲルサイモグラフィーによる知見から、乾燥重量あたりのゼラチン分解活性及び内膜組織の血管平滑筋細胞によるMMP-2産生は年齢と負の相関を示しており、法医学領域で死者の年齢推定への応用の可能性を示唆するものであった(論文準備中)。

切離した内膜組織に対する薬理作用は培養平滑筋細胞に対する反応と類似しており、内膜肥厚から進行性病変への進展を防ぐHMG-CoA還元酵素阻害剤を始めとするいくつかの薬剤をスクリーニングすることができた(論文準備中)。

剖検から得られる血管組織の他に、冠動脈バイパス手術の材料である伏在静脈と内胸動脈の検討で、組織のゼラチン分解活性がバイパス部の開存率に影響を及ぼすことが示唆された(論文準備中)。

ロ) 動脈硬化進行性病変の検討

冠動脈粥腫(プラーク)の破綻は、内因性急死の重要な位置を占める。急性冠動脈症候群の中で、特に血栓の関与が示唆される急性心筋梗塞症例について、MMP-9の活性化率の増大を認めた⁹⁾。FIZで壁在血栓を付したプラークを検討した結果、凝血塊にみられる凝固線溶系の活性が血管壁の平滑筋細胞及びマクロファージ由来のMMP-9活性化に影響を及ぼし、脆弱化に関与する像が認められた(図3)。

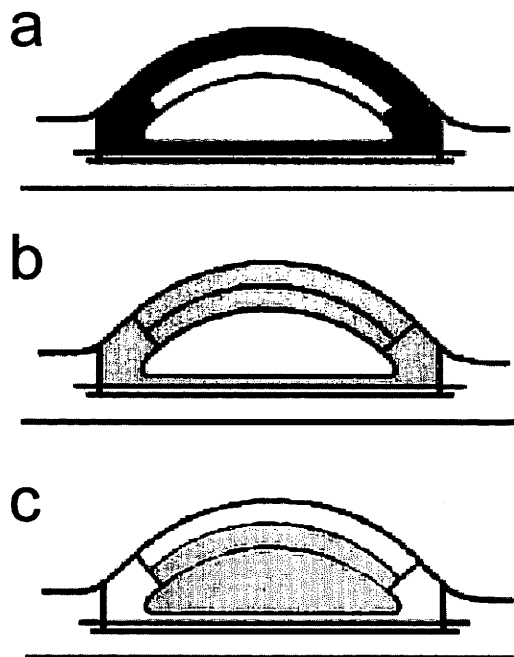


図1. プラーク内基質分解活性の分布

病理解剖で得た大動脈プラークを実体顕微鏡下で切り出し、組織培養上清を消化試験で解析した結果を示す。aの影部は7.50 \pm 5.04 U/mg weight以上の高ゼラチン分解活性域(p<0.001)、同様にbの影部に高コラーゲン分解活性域及びcの影部に高エラスチン分解活性域を示す。

(塚 十全医学雑誌 1996年より改変)

ハ) 動脈瘤材料の検討

大動脈瘤と冠動脈瘤の検討から、外膜のMMP-9の高い活性化率を確認することができた。組織学的に血管外膜組織の毛細血管において、瘤の内圧による血流うっ滞と血栓形成が認められた。脳動脈瘤におけるFIZ所見より、外膜に局在する高いゼラチン分解活性がみられた。

以上の項目に共通して、同じゼラチンを基質とするMMPの中でもMMP-2は生理的な組織リモデリングに関わり、MMP-9は病的状態において活性が高まる傾向にあった。

3. 細胞接着因子、糖鎖及び線溶系因子が修飾する腫瘍及び血管組織の動態

血管壁の内皮細胞、血球系では血小板やマクロファージもMMPsを産生する。ヒト乳癌細胞MDA-MB435のように腫瘍細胞の一部も、産生することが知られている。MMPに関する論文数は年々増加し、多岐にわたる分野で細胞生物学的な修飾に関わっている旨の論文を目にする機会が増えた。Rolliら⁸⁾は、細胞の遊走実験を用いてMMP-9が細胞接着因子 $\alpha v \beta 3$ インテグリンを活性化することによって細胞外マトリックスのビトロネ

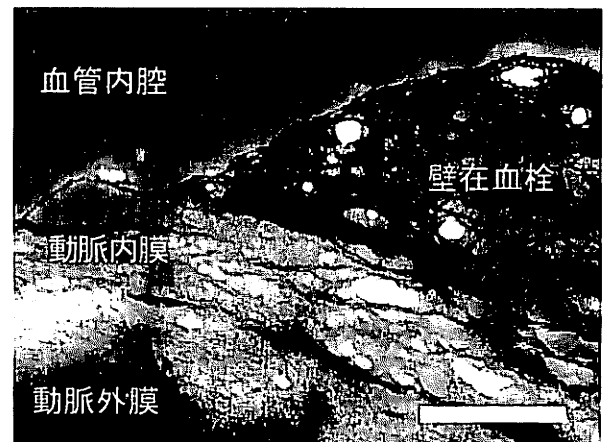


図3. 血栓を付す動脈壁のFIZ所見

下方の動脈壁と右上の壁在血栓において、ボンソー3Rによる染色後、ゼラチン分解活性を示す明るく抜けた部位がみられる。血栓と内膜表面の境界部分に、線溶系亢進に基づくゼラチナーゼの高活性領域が認められる (Bar = 150 μ m)。

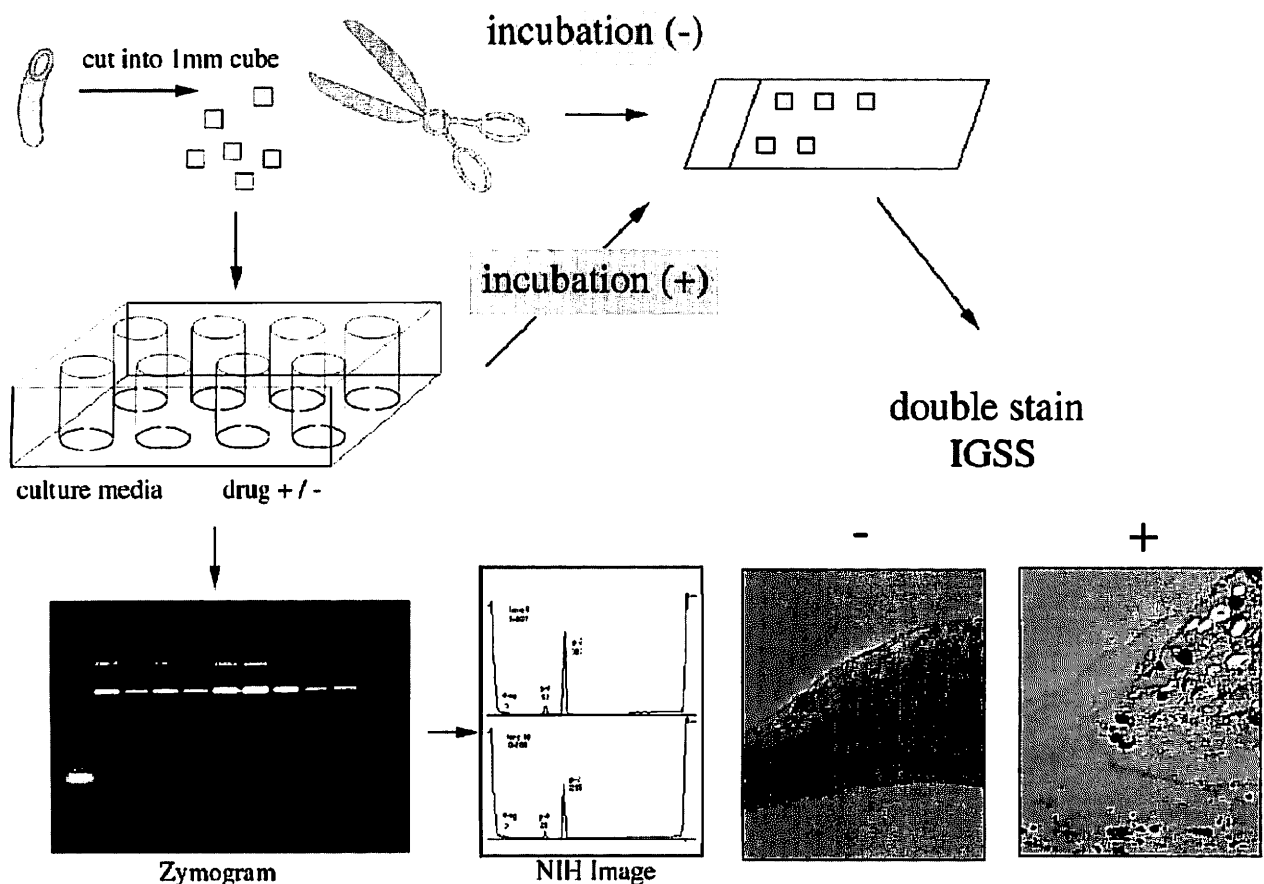


図2. FIZと組織材料解析の流れ

総タンパク量を標準化した組織培養上清を試料とし、0.1%gelatinを基質としたSDS-gel zymographyと抑制試験 (EDTA, セリンプロテアーゼインヒビターあるいはアスパラギン酸プロテアーゼインヒビター) を用いてMMP-2およびMMP-9の分泌および活性化の程度を評価する。またFIZを用いて基質分解が高い部分を組織学的に同定し、MMPによる分解活性亢進に寄与する分子種や担当細胞には免疫染色を加える。たとえば、右下のようにIGSS (immunogold-silver stain)法で黒く染色することで平滑筋アクチン抗原陽性細胞を、同様に可視化された高蛋白質分解活性領域と共に、同一切片上で示することができる。

(Zuka, CRC press⁹⁾より改変)

クチンとフィブロネクチンに足場を形成して浸潤することを示した。

筆者らは血行性転移にみられる血管組織脆弱性に、凝血形成が関与していることを証明するため、血小板機能発現に必須の糖鎖GPIIb α のノックアウトマウスを用いてメラノーマ細胞の転移実験を行った。その結果、移植した腫瘍細胞の新生血管数と原発巣の成長度、及び肺転移の数と大きさが有意に減少した。特に肺転移の頻度は1/15に減少しており、血小板機能正常な腫瘍血栓形成が血行性転移に重要な要因となっていることがわかった⁷⁾。

原発巣及び転移巣において腫瘍の圧排による血流うっ滞、血液凝固線溶系の亢進が認められた。MMP-9を活性化することで動脈硬化プラーク破裂の原因となる壁内血栓由来の線溶系因子plasminの役割が、悪性腫瘍の脈管侵襲及び転移部位における血管外進展で再現できた。

4. サイトカインによる腫瘍進展に必要な組織リモデリング及び血行性転移に関わる血管壁の脆弱性

上記脈管侵襲の他、腫瘍の悪性形質で重要な項目のひとつとして、腫瘍により誘導され個々の腫瘍細胞に介在する間質の量を上げることができる。腫瘍塊の辺縁に誘導された結果、介在する間質細胞の量が豊富で、腫瘍部分と正常部分の境界が不明瞭な場合、組織学的に浸潤性が強いという判断が下される。腫瘍に介在する間質の量と腫瘍の組織型に影響を与える腫瘍血管の脆弱性を検討するために、プライオトロフィン産生性乳癌のモデルマウスを作製した。プライオトロフィンは136アミノ酸からなり、ミドカインと共にヘパリン結合性成長因子に属するサイトカインである。Ptn遺伝子はプロトオンコジーンで、ヒト乳癌の80%近くの症例で蛋白が確認されている。また、プライオトロフィンは腫瘍細胞の他、損傷を受けた皮膚の線維芽細胞に発現し、皮膚の開放創において血管新生を誘導する事実がある⁸⁾。

このような背景の下、悪性度の高い腫瘍の発生及び進展にプライオトロフィンが与える影響を、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)プロモーターで標的されたPtnを有する遺伝子改変マウスを用いて解析した。プライオトロフィンを産生及び分泌する癌細胞が、微小環境の下、細胞外マトリックスの産生と分解を制御しながらスキラス形式で浸潤し、同時に血管径の大きい腫瘍血管が間質に観察された⁹⁾。壁厚の薄く大きな径を有する脆弱な新生血管を伴う例では、腫瘍のMMP-9の高発現と肺転移を認めた。病変や損傷を原因とした血管の修復・再生機転が、腫瘍による血管誘導や病的血管新生に至る経路の一部を共有していると考えられた。

5. 今後の課題とまとめ

治療戦略の面から：

少なくともプロテアーゼ活性を軸に血管壁の脆弱性を検討した場合、MMP阻害剤の医療への応用は、組織の再生に必要な血管組織リモデリングを考慮の上で、予薬の経路及びメリットとデメリットのバランスを慎重に判断されなくてはならない。

法医学実務への応用の面から：

動脈瘤の自然経過を経た破綻、死亡例は法医学領域に独特なものである。また、急死事例におけるうっ血で観察される

暗赤色流動性血液がどのような機序でもたらされるのかは、未だ十分な理由が説明されていない。血小板を含めた細胞成分と血管壁細胞成分とのクロストークの理解に我々の方法が有用であると思われる。

最後に、MMPsに着眼した血管壁脆弱性の研究では、今後微小環境でみられる血栓が重要な鍵となることが予想される。

謝 辞

本研究は、金沢大学大学院医学系研究科法・社会環境医学大島徹主任教授の下、新たに法医学領域で展開をしていく予定である。現在心疾患や脳血管障害を対象にした内因性急死を対象に、特に法医学実務に還元可能な研究成果を目標としている。大学院生時代、人体病理学の基礎を授けて下さった中西功夫先生(金沢大学名誉教授、現アルプ病理研究所顧問)に感謝いたします。最後に、本稿執筆の機会を与えて下さった金沢大学十全医学会編集委員長井関尚一教授ならびに関係の方々に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 塚 正彦, ヒト大動脈粥状硬化におけるマトリックスメタロプロテアーゼの免疫組織化学および生化学的研究. 金沢大学十全医学会雑誌 105: 81-93, 1996
- 2) 塚 正彦, 上田善道, 地崎赴美子, 勝田省吾. 大動脈粥状硬化巣におけるエラスチンを基質とする各種matrix metalloproteinasesのmRNAの発現. 金沢医科大学総合医学研究 所年報9: 145-157, 1998
- 3) Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 94: 2493-2503, 1994
- 4) Zuka M. Proteolytic activity demonstrated by film *in situ* zymography (FIZ): A novel double staining method also involving immunogold-silver staining. In GW Hacker and RM Tubbs (eds), Molecular Morphology of Human Tissues with Light Microscopy, p245-252, CRC Press, New York 2004
- 5) Zuka M, Okada Y, Nemori R, Fukuda A, Takekoshi N, Nakanishi I, Katsuda S. Vascular tissue fragility assessed by a new double stain method. Appl Immunohistochem Mol Morphol 11: 78-84, 2003
- 6) Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B. Activated integrin α v β 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 9482-9487, 2003
- 7) Jain S, Zuka M, Liu J, Russel S, Dent J, Guerrero JA, Forsyth J, Maruszak B, Gartner TK, Felding-Habermann B, Ware J. Platelet glycoprotein Ib α supports experimental lung metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9024-9028, 2007
- 8) Deuel TF, Zhang N, Yeh HJ, Silos-Santiago I, Wang ZY. Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway. Arch Biochem Biophys 397: 162-171, 2002
- 9) Chang Y*, Zuka M*, Perez-Pinera P, Astudillo A, Mortimer J, Berenson JR, Deuel TF. Secretion of pleiotrophin stimulates breast cancer progression through remodeling of the tumor microenvironment. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 10888-10893, 2007

* Equal contribution